



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 196 31 919 C 2**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/11
C 07 H 21/02
C 12 N 15/63

②① Aktenzeichen: 196 31 919.6-41
②② Anmeldetag: 7. 8. 96
④③ Offenlegungstag: 12. 2. 98
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 16. 7. 98

DE 196 31 919 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:

Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑦④ Vertreter:

Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

⑦② Erfinder:

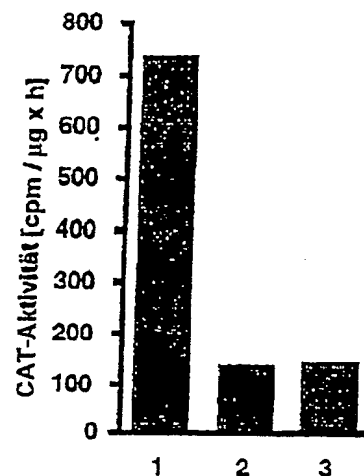
Werner, Dieter, Prof. Dipl.-Chem. Dr., 69118
Heidelberg, DE; Granzow, Christof, Dr., 69121
Heidelberg, DE; Joswig, Gaby, Dipl.-Biol., 68167
Mannheim, DE; Rothbarth, Karsten, Dipl.-Chem.
Dr., 69493 Dossenheim, DE; Schubert, Marie, 69121
Heidelberg, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

WO 94 12 633

⑤④ Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur

⑤⑦ Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen,
wobei die Anti-Sinn-RNA in Form eines sie kodierenden
Vektors vorliegt.



DE 196 31 919 C 2

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur, eine sie enthaltende Kombination sowie die Verwendung beider.

- 5 WO 94/12633 beschreibt bestimmte Anti-Sinn-Sequenzen von Nukleotidbasen, die an einem oder beiden Enden der Anti-Sinn-Sequenz weitere Nukleotide besitzen, die eine Sekundärstruktur bilden.

Neue Techniken zur Hemmung der Genexpression umfassen häufig den Einsatz von Anti-Sinn-RNA. Dies ist eine RNA, die zu Bereichen der mRNA eines Gens komplementär ist und an diese bindet. Es entsteht ein Duplexmolekül, das der Translation der mRNA entzogen ist. Damit kann eine Hemmung der Genexpression erreicht werden.

- 10 Es hat sich allerdings gezeigt, daß das Duplexmolekül häufig nicht stabil ist, d. h. die mRNA wird wieder frei für die Translation, wodurch die Hemmung der Genexpression schwach ist oder gar nicht eintritt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem eine starke Hemmung der Genexpression erzielt werden kann.

- 15 Erfindungsgemäß wird dies durch eine Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen erreicht, wobei die Anti-Sinn-RNA in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegt.

Mit dem Ausdruck "besonderer Sekundärdruck" ist gemeint, daß es sich nicht um eine natürlich vorkommende Sekundärstruktur handelt, sondern daß diese künstlich erzeugt worden ist.

- 20 Der Ausdruck "Anti-Sinn-RNA" umfaßt jegliches RNA-Molekül, das sich als Anti-Sinn-RNA eignet, d. h. komplementär zu Bereichen einer RNA, insbesondere mRNA und ganz besonders Regulationselementen dieser, ist und durch Bindung an diese Bereiche eine Hemmung der Genexpression bewirkt. Die Anti-Sinn-RNA kann auch DNA-Sequenzen umfassen. Erfindungsgemäß liegt die Anti-Sinn-RNA in Form eines sie kodierenden Vektors vor. Ein solcher Vektor kann ein üblicher Expressionsvektor sein. Günstig kann es sein, wenn die Expression der für die Anti-Sinn-RNA kodierenden Sequenz unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors, wie eines Gewebe- oder Tumorspezifischen Promotors, steht.

- 25 Der Ausdruck "Sekundärstruktur" umfaßt jegliche DNA- und/oder RNA-Sequenz, die in einer Anti-Sinn-RNA vorliegen kann und eine zumindest teilweise "Hairpin"-Struktur aufweist, d. h. einzelne Basenpaare unterliegen einer Rückfaltung. Die Sekundärstruktur kann innerhalb der Anti-Sinn-RNA vorliegen. Auch kann sie am 5'- und/oder 3'-Ende der Anti-Sinn-RNA vorliegen. Liegen mehrere Sekundärstrukturen vor, können diese gleich oder verschieden voneinander sein. Vorzugsweise ist die Sekundärstruktur eine $(GC)_n$ -Palindrom- $(GC)_n$, $(AT)_n$ -Palindrom- $(AT)_n$, oder $(CG)_n$ -Palindrom- $(CG)_n$ -Sequenz, wobei es besonders bevorzugt ist, wenn $n=20$ und das Palindrom eine EcoRI-Restriktionsstelle ist. Bevorzugt sind auch komplizierte Palindrome wie $(AGCT)_n$ oder $(GAATTC)_n$.

- 30 Eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist es, durch Oligonukleotidsynthese eine doppelsträngige $(GC)_{20}$ -EcoRI- $(GC)_{20}$ -Sequenz herzustellen und diese an das 5'-Ende der cDNA-Sequenz eines zu hemmenden Gens zu ligieren. Das erhaltene DNA-Molekül wird in 3'→5, Richtung an den Promotor eines Vektors ligiert. Der erhaltene Vektor führt zur Expression der erfindungsgemäßen Anti-Sinn-RNA. Ergänzend wird auf Sambrook, Fritsch, Maniatis, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, verwiesen.

- 35 Eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA kann in Form eines sie kodierenden Vektors in Zellen eingebracht werden. Die Zellen können jegliche Zellen, wie Pflanzen- und tierische, insbesondere Säugetier- und ganz besonders menschliche Zellen, sein. Die Zellen können innerhalb eines Organismus oder außerhalb eines solchen vorliegen. Letztere können frisch isoliert oder in Kultur gehalten sein. Das Einbringen der Anti-Sinn-RNA in die Zellen kann durch übliche Transfektionstechniken, wie Elektroporation, erfolgen.

- 40 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Kombination aus einer erfindungsgemäßen Anti-Sinn-RNA und einer (ds)RNase. Dies ist eine RNase, die doppelsträngige RNA erkennen und abbauen kann. Eine (ds)RNase findet sich z. B. in dem Hefestamm *Schizosaccharomyces pombe* (pac1+). In der Kombination kann die erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegen. Ebenso kann die (ds)RNase als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegen. Ein solcher Vektor kann ein üblicher Expressionsvektor sein. Günstig kann es sein, wenn die Expression der für die (ds)RNase kodierenden Sequenz unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors, wie eines Gewebe- oder Tumorspezifischen Promotors, steht. Ferner kann es von Vorteil sein, wenn die Kombination darin besteht, daß ein Vektor vorliegt, der sowohl für die erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA als auch für die (ds)RNase kodiert. Hinsichtlich des Vektors wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

- 45 Die Kombination aus einer erfindungsgemäßen Anti-Sinn-RNA und einer (ds)RNase kann in Zellen eingebracht werden. Hinsichtlich der Zellen und des Einbringens der Anti-Sinn-RNA wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Die (ds)RNase kann als solche, d. h. als Protein, durch übliche Verfahren, wie Lipofektion, eingebracht werden. In Form eines sie kodierenden Vektors kann die (ds)RNase durch Verfahren eingebracht werden, wie sie für die Anti-Sinn-RNA genannt wurden.

- 50 Die vorliegende Erfindung stellt eine Anti-Sinn-RNA und eine sie enthaltende Kombination bereit, die eine starke Hemmung der Genexpression bewirken. Die vorliegende Erfindung findet somit eine breite Anwendung in der Molekularbiologie und der Medizin. Insbesondere kann an die Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen gedacht werden, bei denen einzelne Proteine auslösend oder verstärkend sind. Dies sind z. B. Erkrankungen, bei denen Hormone eine große Rolle spielen, Tumorerkrankungen und virale Infektionen, wie HIV und AIDS.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

- 65 Fig. 1 zeigt die Hemmung der Genexpression durch eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA. (1) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA. (2) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur I. (3) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA

mit Sekundärstruktur II.

Fig. 2 zeigt die Hemmung der Genexpression durch eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA. (1) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur I. (2) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur I und einer (ds)RNase.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Herstellung von Expressions-Vektoren, die das Chloramphenicolacetyltransferase (CAT)-Gen in 5'→3' bzw. 3'→5' Richtung enthalten

Das CAT-Gen wurde aus einem üblichen CAT-Vektor isoliert und in die "multiple cloning site" des Expressionsvektors pJ3Ω (vgl. Nucleic acids res. 18, (1990), 1068) inseriert. In einem Fall erfolgte die Insertion in 5'→3' Richtung und es wurde der Expressionsvektor pJ3Ω-CAT erhalten. Im anderen Fall erfolgte die Insertion in 3'→5' Richtung und es wurde der Expressionsvektor pJ3Ω-TAC erhalten.

Beispiel 2

Herstellung von Expressionsvektoren, die das CAT-Gen in 3'→5' Richtung und eine für eine Sekundärstruktur I bzw. II kodierende Sequenz enthalten

(A) Expressionsvektor mit einer (GC)₂₀-EcoRI-(GC)₂₀-Sequenz am 5'-Ende des CAT-Gens (Sekundärstruktur I)

1. Herstellung einer (GC)₂₀-EcoRI-(GC)₂₀-Sequenz

(a) Mittels eines automatischen Synthese-Geräts (Oligonukleotid-Synthesizer) wurden 2 Oligodesoxynukleotide hergestellt:

AATTC-(GC)₂₀-G

und

G-(GC)₂₀-CTTAA

(b) Die beiden Oligodesoxynukleotide wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt, auf 90°C erhitzt, danach langsam unter "annealing"-Bedingungen auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei entstand ein DNA Doppelstrang folgender Struktur:

AATTC-(GC)₂₀-G

* * *

G-(GC)₂₀-CTTAA

(c) Unter Ligationsbedingungen entstanden Vielfache der in (b) beschriebenen DNA

AATTC-(GC)₂₀-GAATTC-(GC)₂₀-GAATTC-(GC)₂₀-G

* * * * * * * *

G-(GC)₂₀-CTTAAG-(GC)₂₀-CTTAAG-(GC)₂₀-CTTAA . . .

(d) Die Ligationsprodukte wurden durch Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und eine Sequenz, bestehend aus Dimeren, wurde aus dem Gel eluiert und mittels Polynukleotidkinase /ATP phosphoryliert.

AATTC-(GC)₂₀-GAATTC-(GC)₂₀-G-P

* * * * *

P-G-(GC)₂₀-CTTAAG-(GC)₂₀-C

(e) Diese Sequenz wurde zunächst in die EcoRI-Stelle des üblichen Klonierungsvektors pBluescript (Stratagene) eingesetzt, aus dem sie durch geeignete Restriktionsenzyme zur Umklonierung in den Vektor, der das CAT-Gen in 3'→5' Richtung aufweist, entnommen werden konnte.

2. Einbau der (GC)₂₀-EcoRI-(GC)₂₀ Sequenz in den Vektor, der das CAT-Gen in 3'→5' Richtung aufweist

Der Vektor pJ3Ω-TAC von Beispiel 1 wurde in der "multiple cloning site" zwischen dem Promotor und der TAC-Insertion mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. Die (GC)₂₀-EcoRI-(GC)₂₀ Sequenz wurde mit den entsprechenden Enzymen aus dem pBluescript-Vektor von Beispiel 2(e) entnommen. Die beiden Nukleinsäuren wurden per Ligation verbunden. Es wurde der Expressionsvektor pJ3Ω-TAC-Sek. I erhalten.

(B) Expressionsvektor mit einer (GC)₂₀-EcoRI-(GC)₂₀-Sequenz am 3'-Ende des CAT-Gens (Sekundärstruktur II)

Die unter Beispiel 2 (A) hergestellte (GC)₂₀-EcoRI-(GC)₂₀-Sequenz wurde in den Vektor pJ3Ω-TAC am 3'-Ende des TAC-Gens eingesetzt. Es wurde der Expressionsvektor pJ3Ω-TAC-Sek.II erhalten.

5

Beispiel 3

Herstellung eines Expressionsvektors, der für eine (ds) RNase kodiert

10 Aus einer üblichen genomischen Bibliothek von Schizosaccharomyces pombe wurde mittels einer PCR-Amplifikation das für eine (ds)RNase kodierende Gen (pac1+) isoliert. Hierzu wurden Primer verwendet, die aus der bekannten Sequenz des Gens pac1+ (vgl. Datenbank: embl: S78982) abgeleitet worden waren. Das Gen pac1+ wurde in dem bekannten Vektor pBluescript kloniert und durch Sequenzierung bestätigt. Nach Umklonierung in den üblichen Expressionsvektor pcDNA3 (In Vitrogen) wurde der Expressionsvektor pcDNA3-pac1+ erhalten.

15

Beispiel 4

Hemmung der Genexpression durch eine Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur

20 (a) Ehrlich Ascites Tumorzellen (10⁷ Zellen/ml) wurden mit den Expressionsvektoren pJ3Ω-CAT, pJ3Ω-TAC, pJ3Ω-TAC-Sek. I bzw. pJ3Ω-TAC-Sek. II transfiziert (vgl. Tabelle 1). Die Transfektion wurde mittels Elektroporation (366V/950yF/Elektrodenabstand D=4mm) durchgeführt. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und Aliquote mit radioaktiv markiertem Chloramphenicol inkubiert. Es wurde die Konversionsrate (in Ac-, Di-Ac-Chloramphenicol) nach DC durch Messung der Radioaktivität bestimmt.

25

Tabelle 1

	1	2	3
30 pJ3Ω-CAT	3μg	3μg	3μg
35 pJ3Ω-TAC	7,5μg	-	-
40 pJ3Ω-TAC-Sek. I	-	7,5μg	-
45 pJ3Ω-TAC-Sek. II	-	-	7,5μg

Aus Fig. 1 geht hervor, daß durch Transfektion von pJ3Ω-TAC-Sek. I bzw. pJ3Ω-TAC-Sek. II (vgl. Fig. 1, (2), (3)) eine stärkere Hemmung der Expression des CAT-Gens erreicht werden kann, als wenn pJ3Ω-TAC (vgl. Fig. 1, (1)) verwendet wird.

50

(b) Ehrlich Ascites Tumorzellen (10⁷ Zellen/ml) wurden mit den Expressionsvektoren pJ3Ω-CAT, pJ3Ω-TAC-Sek. I bzw. pcDNA3-pac1+ transfiziert (vgl. Tabelle 2). Die Transfektionsbedingungen waren wie in Beispiel 4 (a) beschrieben.

55

Tabelle 2

	1	2
60 pJ3Ω-CAT	5μg	5μg
pJ3Ω-TAC-Sek. I	10μg	10μg
65 pcDNA3-pac1 +	-	10μg

Aus Fig. 2 geht hervor, daß durch Kotransfektion von pJ3Ω-TAC-Sek. I mit pcDNA3-pac1+ (vgl. Fig. 2 (2)) eine stärkere Hemmung der Expression von CAT erhalten wird, als wenn pJ3Ω-TAC-Sek. I (vgl. Fig. 2, (1)) alleine verwendet wird.

Somit wird deutlich, daß eine Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur eine größere Hemmwirkung auf die Genexpression hat als eine Anti-Sinn-RNA ohne Sekundärstruktur. Ferner wird deutlich, daß die Hemmwirkung der Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur noch gesteigert werden kann, wenn zusätzlich zu gegebenenfalls natürlich vorhandenen (ds)RNAsen eine (ds)RNase-Aktivität mittels der beschriebenen Verfahren hervorgerufen bzw. erzeugt wird.

5

Patentansprüche

1. Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen, wobei die Anti-Sinn-RNA in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegt.
2. Anti-Sinn-RNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Sekundärstruktur am 5'- und/oder 3'-Ende der Anti-Sinn-RNA geschaffen worden ist.
3. Anti-Sinn-RNA nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Sekundärstruktur eine $(GC)_n$ -Palindrom- $(GC)_n$ - oder $(CG)_n$ -Palindrom- $(CG)_n$ -Sequenz ist.
4. Anti-Sinn-RNA nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß $n = 20$ und das Palindrom eine EcoRI-Restriktionsstelle ist.
5. Kombination, umfassend die Anti-Sinn-RNA nach einem der Ansprüche 1-4 und eine (ds)RNase.
6. Kombination nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die (ds)RNase in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegt.
7. Verwendung der Anti-Sinn-RNA nach einem der Ansprüche 1-4 und der Kombination nach Anspruch 5 oder 6 zur Hemmung der Genexpression.

15

20

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

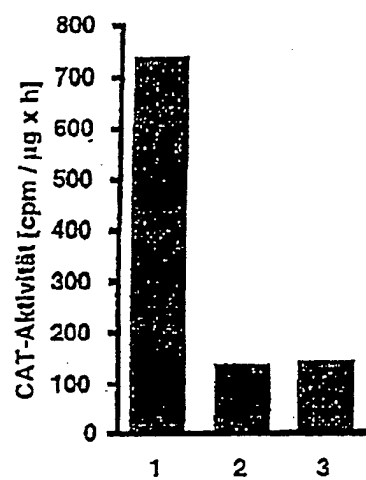


Fig. 1

**ABSTRACT OF THE
DE 196 31 919 C2**

The invention refers to anti-sense-RNA with a special secondary structure. The anti-sense-RNA is present in form of a vector encoding the anti-sense-RNA.